

PRODUÇÃO DE ENZIMAS ACESSÓRIAS RECOMBINANTES PARA SUPLEMENTAÇÃO DE COQUETEL ENZIMÁTICO DE *L.THEOBROMAE* PARA APLICAÇÃO NA HIDRÓLISE DO BAGAÇO

K. KATAYAMA¹, A.G. TAVARES¹, C.B. COSTA¹, V.M. GONÇALVES², J.G.C. PRADELLA¹ e S. FREITAS¹

¹ Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE)

² Instituto Butantan, Centro de Biotecnologia
E-mail para contato: karla.yukari@bioetanol.org.br

RESUMO – A produção de coquetéis enzimáticos eficientes é imprescindível para a hidrólise de material lignocelulósico visando à obtenção de açúcares fermentescíveis. Uma das abordagens mais promissoras é o enriquecimento de coquetéis fúngicos em termos de atividades que lhes faltam, que podem ser obtidas através de sistemas heterólogos. O objetivo deste trabalho é o desenvolvimento do processo de produção de hidrolases recombinantes em *E. coli* visando à suplementação do coquetel enzimático do fungo *L. theobromae* para aplicação eficiente na sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado, uma vez que a caracterização do coquetel secretado por este fungo evidenciam a carência de celulases, em especial da classe endoglucanásica, em sua composição. A plataforma de expressão heteróloga está baseada na linhagem comercial *E. coli* SE1 cujo sistema de estabilização independe de antibiótico, reduzindo custos na produção da enzima, além de facilitar o tratamento dos efluentes. A construção dos clones em SE1 e os ensaios de expressão da endoglucanase demonstram que este sistema de expressão é promissor.

1. INTRODUÇÃO

A reação da hidrólise enzimática permanece como uma etapa crítica no processo de conversão de biomassa lignocelulósica em etanol, sendo que uma grande variedade de atividades enzimáticas é necessária. As preparações enzimáticas comerciais atualmente disponíveis para a despolimerização de materiais lignocelulósicos são misturas complexas de proteínas isoladas a partir de fungos filamentosos, tais como *Trichoderma reesei*. As atuais misturas de enzimas comerciais, genericamente nomeadas “celulase”, contêm entre 80 e 200 proteínas (Banerjee *et al.*, 2010). No entanto, exceto por algumas das celulases e hemicelulases melhor caracterizadas, conhece-se muito pouco sobre a maioria destas proteínas presentes.

O aumento da eficiência dos coquetéis enzimáticos está relacionado com a expressão balanceada das diferentes atividades necessárias para a desconstrução da parede celular. Muitas destas atividades são produzidas em baixíssimas concentrações por fungos, mesmo aqueles considerados super produtores. Tais proteínas são excelentes candidatas para a expressão heteróloga a fim de se poder suplementar coquetéis fúngicos. Assim, torna-se importante o desenvolvimento de plataformas de expressão heteróloga robustas capazes de produzir enzimas a baixo custo com o mínimo de limitações no que diz respeito à utilização em larga escala.

Dentre os hospedeiros heterólogos utilizados, *Escherichia coli* destaca-se fortemente na produção de proteínas recombinantes, seja na indústria farmacêutica, veterinária, alimentícia, entre outros. A principal motivação está no fato de este ser um organismo bem caracterizado do ponto de vista genético, fisiológico e de expressão (Choi *et al.*, 2006). Apesar de todas as conhecidas vantagens do uso da *E. coli* como hospedeiro, a instabilidade plasmidial é uma preocupação significativa para a utilização industrial destes OGMs, uma vez que estas construções utilizam vetores bacterianos que contêm um gene de resistência a antibiótico como marcador seletivo (Spirer *et al.*, 2005; Peubez *et al.*, 2010). Os antibióticos (ou seus produtos oriundos da degradação) podem contaminar a biomassa ou produto, tornando-se necessária a sua remoção do produto final e efluente (Spirer *et al.*, 2005). Além disto, o uso de antibióticos em condições de cultura intensiva (alta densidade celular e/ou cultivo contínuo) não é eficiente devido à sua diluição ou inativação (Baneyx, 1999). Na questão regulatória, o grau de aceitabilidade está restrito a canamicina e tetraciclina, contudo há uma expectativa de que haja “tolerância zero” em relação aos sistemas de produção e seleção baseados em antibióticos (Sodoyer *et al.*, 2012).

Neste contexto, algumas abordagens têm sido estudadas sendo as mais promissoras a utilização de marcadores auxotróficos baseados na complementação de uma mutação ou deleção no DNA genômico do hospedeiro (Vidal *et al.*, 2008) e a manutenção baseada no sistema “antídoto-toxina” (Szipirer e Milinkovitch, 2005). Nos estudos de Spirer e Milinkovitch (2005), foi demonstrado que após 20 gerações (em meio seletivo ou não), 100% das bactérias ainda continham o plasmídeo. Duas horas após indução, os plasmídeos ainda estavam presentes em todas as bactérias, o que não é o caso em um sistema padrão pET/BL21(DE3).

O presente trabalho tem como objetivo validar a estratégia de obtenção de um sistema de expressão livre de antibiótico e apresentar os dados de construção e obtenção do clone de *E. coli* SE1 para a expressão de endoglucanase recombinante visando suplementar o coquetel enzimático do coquetel do fungo *Lasiodiplodia theobromae* MIBA-0016 a fim de torna-lo mais eficiente para a hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. PaineL enzimático

O fungo utilizado neste trabalho foi o *Lasiodiplodia theobromae* MIBA-0016, isolado do bioma amazônico e cedido pelo Prof. Alberdan Santos da Universidade Federal do Pará. O microorganismo foi mantido em geladeira em PDA e repicado periodicamente para a sua manutenção. Para a caracterização do coquetel enzimático secretado pelo fungo, foi realizado um cultivo de acordo com as condições otimizadas por Costa (2013) e realizado um ensaio enzimático contra diferentes substratos, p-nitrofenol (p-NP) e os derivados de celulose e materiais não celulósicos, com posterior determinação da quantidade de açúcar redutor liberado. As atividades do coquetel enzimático obtidas encontram-se apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Valores de atividade enzimática obtidas em ensaio de paineL enzimático com coquetel fúngico produzido por *Lasiodiplodia theobromae*.

Substrato	Atividade volumétrica (U/ml)	Atividade específica (U/mg)
CMC	1,149	3,407
Larch arabinogalactan	0,425	1,261
Linear arabian	0,657	1,950
Glucomanana	9,159	27,167
Beta-glucana	2,139	6,344
1,4-β-D-manana	2,842	8,429
Pectina	0,865	2,567
Xilana	18,918	56,118
pNpC	0,396	1,175
pNpG	0,532	1,579
Atividade celulolítica total (Fpase)		
FPU/mL	FPU/mg	
0,491	1,458	

As condições de crescimento do fungo foram em tampão ftalato de sódio, pH=5,9; temperatura de 29°C, tendo como fonte de carbono principal o bagaço da cana de açúcar pré tratado hidrotérmicamente e com NaOH a 1,5%. As atividades enzimáticas em substratos hemicelulósicos tais como Glucomanana, β-glucana, 1,4-β-D-manana e Xilana apresentam atividades expressivas quando comparadas à atividade total celulolítica (0,49 FPU/mL) ou mesmo a atividade contra o CMC levando-se a concluir que este coquetel apresenta uma deficiência de atividades relacionadas à hidrólise de celulose e portanto enzimas das classes endoglucanásicas, celobiohidrolásicas, e enzimas auxiliares tais como as expansinas, são as potenciais candidatas à suplementação deste coquetel.

2.2. Sistemas de expressão

O microrganismo utilizado no estudo foi a *Escherichia coli* BL21 (DE3) (Merck, USA), portando o vetor pET-28a(+) (Novagen), carregando o gene da enzima β -1,3-1,4-glucanase, uma endoglucanase proveniente de *Bacillus subtilis*. O vetor em questão possui um gene de resistência à canamicina e a expressão da proteína recombinante é regulada através do Operon lac (Figura 1).

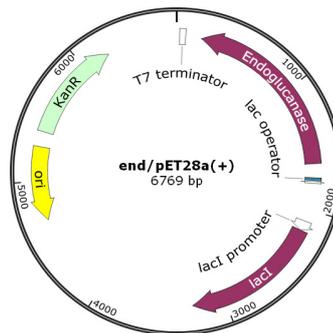


Figura 1 – Mapa do plasmídeo construído em vetor pET-28a(+) com o inserto de β -1,3-1,4-glucanase.

A partir deste sistema de expressão foi realizada a clonagem para possibilitar expressão na linhagem SE1 (Delphi Genetics, Bélgica), a qual possui em seu genoma o gene que codifica a proteína ccdB, um inibidor de DNA girase, letal à bactéria. A ação tóxica do ccdB pode ser evitada pela presença da proteína ccdA, cujo gene deve estar no plasmídeo, formando assim o sistema de estabilização do plasmídeo sem a necessidade do uso de antibióticos. A construção do vetor foi realizada a partir da clonagem do cassete do gene ccdA do plasmídeo pStaby (Figura 2a), fornecido no kit StabyExpress (Delphi Genetics) e adicionando-o ao plasmídeo já construído end/pET-28a(+) (Figura 2b).

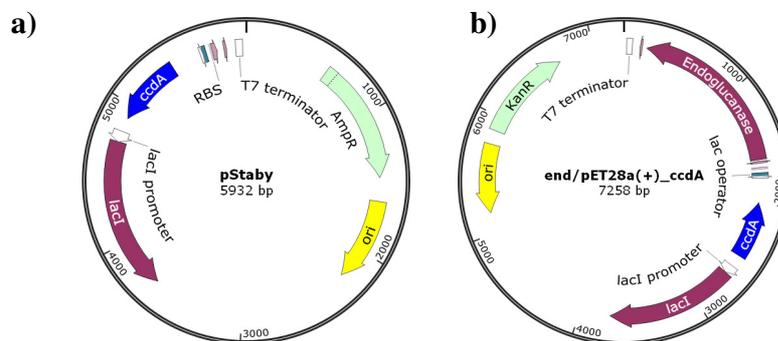


Figura 2 – Mapa do plasmídeo pStaby (a) e do plasmídeo com o inserto de β -1,3-1,4-glucanase e cassete ccdA em pET-28a(+) (b), evidenciando a localização do cassete subclonado.

Após a reação de ligação ser realizada, este produto foi utilizado para transformar células SE1 eletrocompetentes. Para confirmar a presença do gene da endoglucanase e do cassete do gene *ccdA* foram realizadas reações de PCR com *primers* específicos a eles (Tabela 2).

Tabela 2 – Primers utilizados na reação de PCR para confirmação da presença do gene de interesse da endoglucanase e do cassete *ccdA*.

Primer	Sequência
ccdAF	5' – GAGCATGCGTTGTCCACGTTGTCCACGGGCCGAGCG – 3'
ccdAR	5' – CCGCATGCTCACCAGTCCCTGTTCTCG – 3'
endFBamHI	5' – TATATAGGATCCGCAGCAGGGACAAAAACGCC – 3'
endRXhoI	5' – ATATATCTCGAGATTTGGTTCTGTTCCCAAAA – 3'

2.2. Ensaios de expressão da endoglucanase recombinante

Os experimentos deste trabalho foram realizados em frascos tipo *Erlenmeyer* de 500mL, sob agitação de 250rpm a 37°, em *shaker* (Innova 44 – New Brunswick Scientific). A partir de 1 colônia positiva transformante das células de expressão, foram preparados inóculos em 20 mL de meio LB (0,5% extrato de levedura, 1% triptona, 1% NaCl). Os ensaios de crescimento e expressão foram realizados com os dois sistemas de expressão, BL21/pET28a e SE1/pET28a_cca, sendo testadas as condições de cultivo na ausência e presença de antibiótico (30µg/mL de canamicina) para ambas as linhagens. Amostras foram coletadas no intervalo de 1h durante 9 horas de cultivo, acompanhando-se a densidade óptica em espectrofotômetro a 600nm (Thermo Scientific – Evolution 60). Ao atingir a absorbância entre 0,8 e 0,9 as culturas foram induzidas com a adição de 1mM de Isopropil-β-d-tiogalactopiranosídeo (IPTG, Sigma-Aldrich).

2.3 Metodologia analítica

As amostras coletadas foram centrifugadas a 12.000g por 5 minutos a 4°C e o *pellet* resultante foi ressuspenso em tampão de lise (25mM Tris-HCl pH7,5, 150mM NaCl, 0,3mg/mL lisozima, e 1mM PMSF), seguido de sonicação (*Sonics - Vibra Cell*). As amostras foram novamente centrifugadas, sendo o sobrenadante recuperado para determinação de atividade enzimática e concentração de proteínas totais.

A concentração de proteínas totais foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando o reagente *Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent* (Biorad), seguindo as instruções do fabricante. Para a curva de calibração, foi utilizado albumina de soro bovino (BSA), de 0,05-0,5 mg/mL. A expressão da proteína foi analisada qualitativamente através de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12% (Laemmli, 1970), a 120V por cerca de 1h20. Após a corrida, os géis foram revelados com Azul Brillante de Coomassie R-250. As amostras foram ajustadas para aplicação correspondente à quantidade de 3µg de proteínas totais.

A atividade enzimática foi determinada segundo protocolo de Ghose (1987), usando Carboxi-metil-celulose 0,5% como substrato. 40µL de tampão acetato foram distribuídos em microplacas de 96 poços e 10µL da amostra foram adicionados, seguido de 50µL do substrato. Após a reação ser incubada a 50°C por 30 minutos em termociclador (Eppendorf, USA), a quantidade de açúcares redutores foi determinada pelo método do DNA (ácido 3,5-dinitrosalicílico) (Miller, 1959). A curva de calibração foi construída com concentrações de 0,5-5 mM de glucose. A unidade de atividade enzimática foi definida como sendo a quantidade de enzima que libera 1 mmol de glucose por minuto, sendo que as atividades específicas foram determinadas como unidades por mg de proteína.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Obtenção do sistema de expressão em SE1

Com a obtenção de colônias transformantes, foi realizada reação de PCR com o plasmídeo extraído para confirmar a presença do inserto de endoglucanase usando os pares de *primers* endFBamHI e endRXhoI, utilizando como controle positivo a construção em pET28a(+) em que sabia-se previamente da presença do gene (1432pb). Foi realizada também a reação com os pares ccdAF e ccdAR para confirmar a presença do cassete ccdA (484pb). Foi utilizado como controle positivo o plasmídeo pStaby, de onde foi subclonado tal cassete. A eletroforese em gel de agarose 1% revelou a confirmação da clonagem, indicando bandas nas alturas desejadas (1500 e 500 pb), as mesmas dos controles positivos (Figura 3).

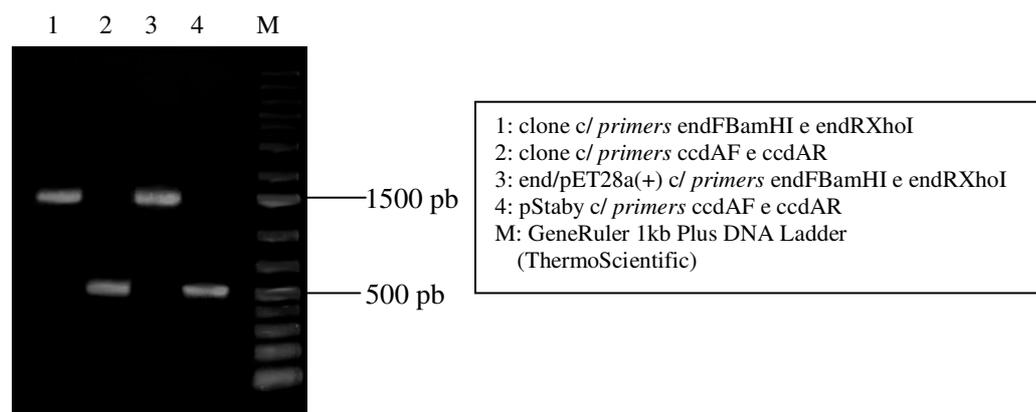


Figura 3 – Gel de agarose 1% com produtos da PCR para confirmação da clonagem.

A estratégia de construção do sistema de expressão em SE1 está definida e a obtenção dos próximos clones para as demais enzimas será facilitada, seguindo o protocolo estabelecido na clonagem do plasmídeo end/pET28a_ccdA.

3.3. Ensaios de expressão da Endoglucanase

Foi realizada avaliação de expressão e estabilização plasmidial em estudos em frascos agitados para a produção da proteína recombinante β -1,3-1,4-glucanase em linhagem de *E.coli* com sistema independente de antibiótico, comparando-se com a linhagem BL21(DE3). A construção da curva de crescimento das linhagens, como pode ser visualizada na Figura 4, indicou que o crescimento não foi afetado na presença do antibiótico nestas condições de cultivo. As linhagens BL21 e SE1 apresentaram velocidades específicas de crescimento (μ_{max}) semelhantes, sendo a BL21 levemente maior ($0,96h^{-1}$) comparado à linhagem SE1 ($0,94h^{-1}$).

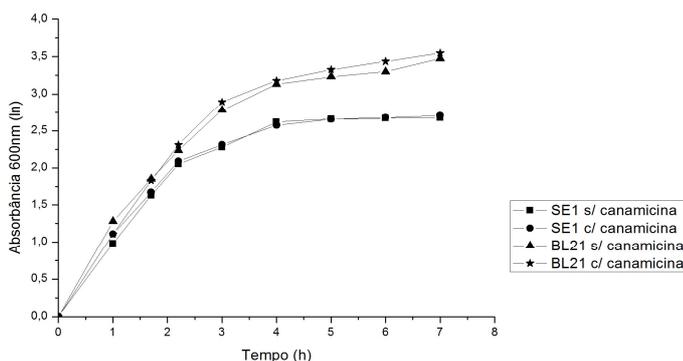


Figura 4 – Curva de crescimento das linhagens BL21 e SE1 para produção de β -1,3-1,4-glucanase, na presença e ausência de sulfato de canamicina (30µg/mL).

Resultados anteriormente apresentados pelo grupo indicaram que o tempo de 3h de indução era o suficiente para atingir os maiores valores para a atividade específica (Silva *et al.*, 2013). Comparando-se os dados de crescimento microbiano e de expressão nas amostras retiradas após 3h de indução (Tabela 3), nota-se que a presença de canamicina não afetou a expressão da proteína recombinante tendo-se obtido praticamente a mesma concentração de proteína total e de atividade específica em cultivos com e sem canamicina. Por outro lado, a ausência de canamicina resultou na redução da expressão da proteína recombinante evidenciado pela queda na atividade específica em cerca de 33%. Observa-se que houve um aumento na concentração da proteína total expressa no cultivo de BL21 em meio sem antibiótico, o que pode estar relacionado com a expressão de proteínas relacionadas ao stresse metabólico pela tentativa de sobrevivência do microorganismo neste meio. Por fim, o plasmídeo foi mantido ao longo de 5h de cultivo, o que representou uma sobrecarga, contudo este comportamento não é esperado em cultivos de alta densidade celular.

Tabela 3 – Parâmetros cinéticos das linhagens BL21(DE3) e SE1 na ausência e presença de antibiótico após 3 horas de indução para produção de endoglucanase.

Parâmetro	BL21		SE1	
	s/ canamicina	c/ canamicina	s/ canamicina	c/ canamicina
$\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1})	0,9451	0,9754	0,9351	0,9463
Densidade óptica (600nm)	3,3100	3,3950	3,400	3,5250
Proteína total (g/L)	4,4063	2,8848	3,1034	3,4483
Atividade volumétrica (U/mL)	2,3972	2,3248	4,9802	5,8968
Atividade específica (U/mg proteína)	0,5440	0,8059	1,6047	1,7101

A eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) indicou que a proteína expressa em SE1 durante o cultivo apresentou o tamanho esperado (cerca de 53kDa) (Figura 5), comparando com a expressão em BL21.

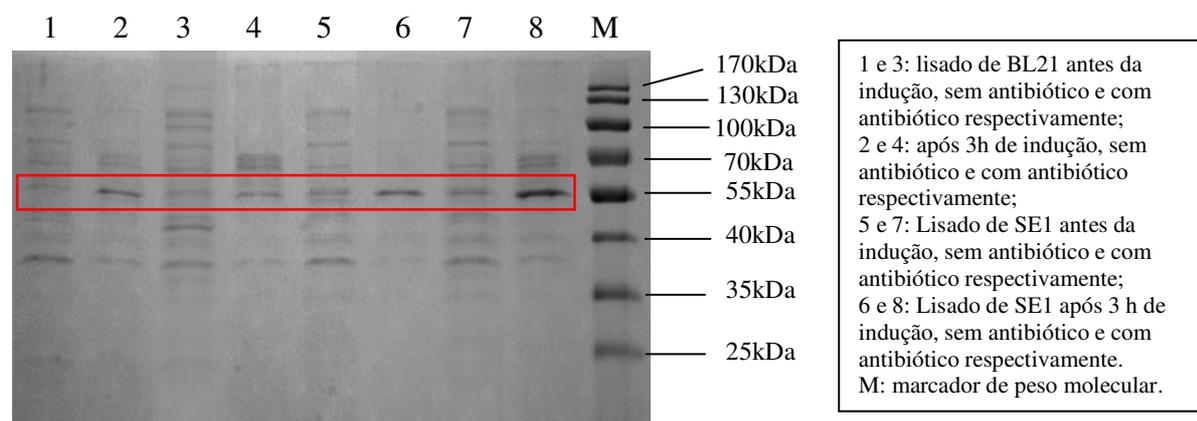


Figura 5 – Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) das amostras de cultivo com BL21(DE3) e SE1.

4. CONCLUSÕES

Os parâmetros cinéticos obtidos neste ensaio em frasco agitado indicaram que a velocidade específica de crescimento das linhagens SE1 e BL21(DE3) foram semelhantes, ou seja, o sistema de estabilidade do plasmídeo utilizando a estratégia de antídoto-toxina é tão eficiente quanto o antibiótico, já conhecido e utilizado, além de não evidenciar nenhuma sobrecarga metabólica à célula.

Visto os resultados promissores obtidos com os ensaios com a endoglucanase, a próxima enzima a ser clonada será a expansina, a qual poderá contribuir para o coquetel do fungo *Lasioidiplodia theobromae*. Além disso, serão validados protocolos para a clonagem de enzimas com diferentes características, uma vez que o objetivo final é usar este sistema de expressão como plataforma para a produção de misturas em co-cultura. Este conhecimento será importante para viabilizar a obtenção de misturas customizadas para os diferentes bagaços pré-tratados.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BANERJEE, G.; CAR, S.; SCOTT-CRAIG, J.S.; BORRUSCH, M.S.; BONGERS, M.; WALTON, J.D. Synthetic multi-component enzyme mixtures for deconstruction of lignocellulosic biomass. *Biores. Tec.*, v. 101, p. 9097–9105, 2010.
- BANEYX, F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.*, v. 10, p. 411-421, 1999.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal. Biochem.*, v. 72, p. 248-254, 1976.
- CHOI, J.H.; KEUM, K.C.; LEE, S.Y. Production of recombinant proteins by high cell density culture of *Escherichia coli*. *Chem. Eng. Sci.*, v. 61, p. 876-885, 2006.
- COSTA, C.B. Avaliação do potencial de produção de enzimas celulolíticas pelo fungo *Lasiodiplodia theobromae* MIBA-0016 por fermentação submersa. *Relatório de Estágio realizado junto ao Prog. Ind. do CTBE*, Campinas, 2013.
- GHOSE, T.K. Measurement of cellulase activities. *Pure Appl. Chem.*, v. 59, 257–268, 1987.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v. 2273, p. 397–407, 1970.
- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, v. 31, 426–428, 1959.
- PEUBEZ, I.; CHAUDET, N.; MIGNON, C.; HILD, G.; HUSSON, S.; COURTOIS, V.; DE LUCA, K.; SPECK, D.; SODOYER, R. Antibiotic-free selection in *E. coli*: new considerations for optimal design and improved production. *Microb Cell Fact.*, v.7, p.65, 2010.
- SODOYER, R.; COURTOIS, V.; PEUBEZ, I.; MIGNON, C. Antibiotic-Free Selection for Bio-Production: Moving Towards a New “Gold Standard”, Antibiotic Resistant Bacteria - A Continuous Challenge in the New Millennium, Dr. Marina Pana (Ed.), ISBN: 978-953-51-0472-8, InTech, 2012.
- SZPIRER, C.Y.; MILINKOVITCH, M.C. Separate-component-stabilization system for protein and DNA production without the use of antibiotics. *Biotechniques*, v. 38, p. 775-8, 2005.
- VIDAL, L.; PINSACH, J.; STRIEDNER, G.; CAMINAL, G.; FERRER, P. Development of an antibiotic-free plasmid selection system based on glycine auxotrophy for recombinant protein overproduction in *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.*, v. 134, p. 127-136, 2008.